取食转 Bt 基因抗虫玉米后亚洲玉米螟幼虫中肠的组织病理变化

徐艳聆[1,2]，王振营[1,*]，何康来[1]，白树雄[1]
（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 沈阳农业大学植物保护学院，沈阳 110161）

摘要：利用透射显微镜(TEM)观察亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée)幼虫取食了表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的转 Bt 基因玉米心叶组织后中肠的组织病理变化，以探讨转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟的致病机理，为其合理、安全和持续利用提供理论依据。结果表明:亚洲玉米螟取食 Bt 玉米后中肠细胞及其细胞器发生了明显的病变。取食 Bt 玉米 12 h后中肠细胞开始病变，首先微绒毛脱落、内质网开始肿胀，24 h 后内质网肿胀、增多，杯状细胞杯腔增大，48 h 后微绒毛大量脱落，细胞开始空泡化，随着取食时间的增加，细胞空泡化程度加剧，在感染前期细胞间的病变程度差异较大。微绒毛脱落、内质网肿胀断裂是在多数取食 Bt 玉米的亚洲玉米螟中肠细胞发生的普遍病变。由此表明，人工修饰的 Cry1Ab 基因导入到玉米染色体组中所表达的杀虫蛋白可使玉米螟幼虫中肠细胞发生病变，最终导致其死亡。

关键词：亚洲玉米螟；转 Bt 基因玉米；Cry1Ab 杀虫蛋白；组织病理变化；透射显微镜
中图分类号：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)09-1034-05

Histopathological changes in the midgut of larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), fed on Bt-transgenic corn expressing Cry1Ab protein

XU Yan-Ling[1,2], WANG Zhen-Ying[1,*], HE Kang-Lai[1], BAI Shu-Xiong[1] (1. State Key Laboratory for the Biology of the Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: To probe the pathogenic mechanism and provide theoretical basis for safety and sustainable utilization of Bt corn, the histopathological changes in the midgut of larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée), fed on Bt-transgenic corn expressing Cry1Ab protein were observed by transmission electron microscopy (TEM). The results showed that the midgut cells and their cell organelles of the *O. furnacalis* larvae fed on the Bt corn tissues exhibited distinct pathological changes. The midgut cells began to change at 12 h after ingestion of Bt corn. The microvilli of the midgut epithelial cells began to fall off and the endoplasmic reticulum became swollen. After 24 h, the number of endoplasmic reticulum increased and the cavity of goblet cell enlarged. Many microvilli sloughed off and cells became vacuolated after 48 h. Cell vacuolation was more obvious with time going. The pathologic degrees were disparate among cells in the early period of infection. Desquamation of microvilli and swelling of endoplasmic reticulum occurred universally in most midgut cells. In conclusion, the insecticidal protein expressing in transgenic Bt corn can cause pathological changes to midgut cells of *O. furnacalis* larvae and kill them finally.

Key words: *Ostrinia furnacalis*; transgenic Bt corn; Cry1Ab protein; histopathological change; transmission electron microscopy (TEM)

基金项目：国家自然科学基金项目(30370967)

作者简介：徐艳聆，女，1978 年生，博士，主要从事转 Bt 基因抗虫玉米生态安全评价研究，现工作单位河南科技学院，E-mail：yanlingxu@eyou.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：wangzy61@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2009-01-18；接受日期 Accepted：2009-07-07

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*（Guenée）是我国玉米生产上最重要的害虫，对玉米的产量和质量影响很大（周大荣和何康来，1995）。由于玉米螟寄主植物种类多，且化性不一，造成世代发生重叠，防治效果不理想，特别是穗期玉米植株高，密度大，防治难度加大。近年来人们利用转基因技术培育抗虫玉米为玉米螟防治提供了新途径，转 Bt 基因抗虫玉米已在多个国家商品化生产种植（Shelton *et al*., 2002），室内和田间结果表明对亚洲玉米螟具有很好的控制作用（He *et al*., 2003；王冬妍等，2004）。我国自主研发的转 Bt 基因玉米也已进入田间释放阶段，国外公司的转 Bt 基因抗虫玉米被批准在我国进行环境释放，有的还进入了生产性试验阶段。

虽然关于 Bt 杀虫蛋白引起昆虫中肠病理变化国内外已有很多报道（Gill *et al*., 1992；项秀芬等，1996； Matínez-ramírez *et al*., 1999；Abdel-razek *et al*., 2002；Cavados *et al*., 2004），但 Bt 玉米与 Bt 杀虫蛋白不同，Bt 玉米导入的是经过人为修饰的 δ-内毒素基因活性片段部分，且带有增强的表达启动子，编码的活性毒素蛋白无需活化即可与靶标害虫中肠上皮细胞的受体结合（Perlak *et al*., 1990；Koziel *et al*., 1993），其病理效应是否与 Bt 杀虫蛋白相同？因此有必要深入研究 Bt 玉米对害虫的病理效应，为延缓抗性、实现转 Bt 基因抗虫作物的持续利用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

采自河北省衡水市在室内用无琼脂半人工饲料（宋彦英等，1999）饲养了 35 代、未接触任何杀虫剂的亚洲玉米螟 3 龄幼虫。

1.2　供试玉米

实验用玉米为孟山都公司的转 *cry1Ab* 杀虫蛋白基因的 Bt 玉米 MON810（品种为 DK647BTY）及其非转基因对照品种（DK647），种植在位于北京的中国农业科学院植物保护研究所农场内。在玉米心叶期从田间采回心叶，在 0.3% 的 NaCl 中浸泡 3 min，用蒸馏水冲洗 3 遍，在滤纸上吸干水分，备用。

1.3　玉米螟幼虫中肠组织取样和中毒症状观察

在人工饲料上饲喂玉米螟幼虫至 3 龄，饥饿 12 h，饲喂转 Bt 玉米 MON810 心叶，处理 100 头幼虫，重复 3 次，在取食 6，12，24，48 和 72 h 后分别取样，每次取样 10 头。取样前，观察玉米螟幼虫在 Bt 和非 Bt 叶片上的取食情况，同时，用毛笔轻轻触动幼虫虫体，观察其活动状况，并观察玉米螟幼虫体表颜色的变化情况。将抽取的幼虫置于冰冷的生理盐水溶液中，在双筒解剖镜下解剖截取中肠并纵剖除去内含物，放于预冷的 2.5% 戊二醛固定液中预固定。以取食非 Bt 玉米 DK647 心叶的玉米螟中肠为对照。

1.4　电镜观察

采用常规透射电镜（TEM）制样方法，四氧化锇-戊二醛双固定，梯度乙醇（50%，70%，80%，90%，95%，100%）及丙酮脱水，812 环氧树酯包埋，EMUC6 型超薄切片机切片，醋酸铀-柠檬酸铅双染色，日立 H-7500 型透射电子显微镜下观察。

2　结果与分析

取食对照玉米的亚洲玉米螟幼虫中肠柱状细胞顶端微绒毛数量众多排列紧密，质膜完整，内质网发达排列整齐，细胞质均匀，杯状细胞的杯腔中细胞质突起较多（图版Ⅰ:A，G，K，L，Q）。亚洲玉米螟幼虫取食 Bt 玉米后 6 h 中肠细胞未发生明显变化，取食 12 h 后柱状细胞微绒毛首先开始肿胀断裂（图版Ⅰ:B，C），内质网部分开始肿胀（图版Ⅰ:H），但病变并未引起昆虫产生中毒症状，到 24 h 微绒毛继续脱落（图版Ⅰ:D），内质网肿胀增多（图版Ⅰ:I），杯状细胞质突起脱落（图版Ⅰ:N），部分杯状细胞杯腔增大（图版Ⅰ:M），个别细胞核拉长变形（图版Ⅰ:R），此时玉米螟取食量明显减少。取食 48 h 后柱状细胞微绒毛明显大量脱落（图版Ⅰ:E），内质网断裂成泡状（图版Ⅰ:J），部分杯腔继续增大挤压周围的柱状细胞（图版Ⅰ:O），随着细胞病变程度的加重，受处理幼虫取食量剧减，虫体收缩，行动迟缓。到染病后期（3 d）微绒毛几乎已经全部脱落（图版Ⅰ:F），细胞内空泡化，部分细胞膜状结构破裂，细胞器消失完全解离（图版Ⅰ:T），此时由于中肠细胞结构破坏严重，受处理幼虫停止取食，身体瘫软，体色发暗，接近死亡。

3　讨论

前人报道昆虫取食 Bt 杀虫蛋白或转 Bt 植物后的主要病理变化为：柱状细胞微绒毛脱落，内质网增多，细胞核拉长、核仁凝聚，杯腔底部的细胞质

突起拉长、脱落，随着感染时间的增加，病变程度越明显（Yiallouros *et al*., 1999；Matínez-ramírez *et al*., 1999；梁革梅等，2001；Abdel-razek *et al*., 2002；Cavados *et al*., 2004；李芳芳等，2007；张永军等，2007）。本研究结果表明转 Bt 基因玉米中表达的 Cry1Ab 杀虫蛋白对亚洲玉米螟幼虫的病理学效应与以上报道基本一致，这也说明导入玉米染色体组后表达的 Cry1Ab 杀虫蛋白同样能与玉米螟中肠细胞的上皮细胞膜刷状缘膜囊泡（brush border membrane vesicles，BBMV）上的特异性位点结合，插入到膜内形成空洞，引起离子渗透，最终导致细胞肿胀崩溃。

亚洲玉米螟幼虫取食表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的 Bt 玉米后，其中肠细胞的病变速度较快，取食后 12 h以内多数细胞的微绒毛均发生典型的病变，但细胞核病变总体较其他敏感昆虫轻，而且仅在少部分细胞中发生，原因尚不清楚，有待进一步研究。在感病前期(1 d)细胞间的病理变化差异很大，有些细胞拉长，内部细胞器减少，开始空泡化，但有些细胞并未发生病变，总体上柱状细胞的病变先于杯状细胞，廖富蘋等(1999)推测可能是由于两种细胞的生理功能差异所致。微绒毛脱落，内质网肿胀断裂是在多数中肠细胞发生的普遍病变，到感病后期由于大量 Ca^{2+} 和水进入细胞，细胞器减少，营养物质自耗，造成多数细胞完全或部分泡化，最终导致幼虫死亡。与其他 Bt 杀虫蛋白的作用机制相似，Bt 基因玉米中表达的 Cry1Ab 杀虫蛋白的主要作用位点也为中肠组织的膜系统，从而引起昆虫拒食，破坏营养吸收与平衡，干扰生长，这与昆虫的最终致死密切相关。本研究为探讨 Bt 玉米对靶标害虫的致死机制及其安全、合理和持续利用提供了理论依据。

参 考 文 献（References）

Abdel-razek AS, Morris ON, White NDG, Salama HS, El-Moursy A, Aboul-Ela R, 2002. Comparative histopathology of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) as affected by *Bacillus thuringiensis* varieties *indiana* or *morrisoni*. *Archiv. Phytopath. Pflanz.*, 35: 307 –320.

Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC, Rabinovitch L, 2004. Histopathological and ultrastructual effects of δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 99: 493 –498.

Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV, 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 615 –636.

He KL, Wang ZY, Zhou DR, Wen LP, Song YY, Yao ZY, 2003. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.*, 96: 935 –940.

Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV, 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 194 –200.

Li FF, Ye GY, Wu Q, Peng YF, Chen XX, 2007. Histopathological changes in the midgut of the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae feeding on transgenic Bt rice. *Acta Entomol. Sin.*, 50: 1 070 –1 076. [李芳芳，叶恭银，吴琼，彭予发，陈学新，2007. 取食转 Bt 基因水稻对稻纵卷叶螟幼虫中肠的组织病理学效应. 昆虫学报，50(10)：1 070 –1 076]

Liang GM, Tan WJ, Guo YY, 2001. Pathological changes in midgut tissues of cotton bollworm larvae after intaking transgenic Bt cotton. *Cotton Sci.*, 13: 138 –141. [梁革梅，谭维嘉，郭予元，2001. 棉铃虫取食转 Bt 基因棉花中肠组织的病理变化. 棉花学报，13(3)：138 –141]

Liao FP, Lin ZJ, Lai HL, Ge CB, Zhang YW, Peng XZ, 1999. Studies on symptoms and cytopathology of midgut tissues of silkworm caused by bacterial toxicosis. *J. South China Agri. Univ.*, 20(1): 108 –112. [廖富蘋，林志坚，赖海亮，葛慈斌，张永文，彭许增，1999. 家蚕卒倒病的病征变化与中肠组织细胞病理的研究. 华南农业大学学报，20(1)：108 –112]

Martīnez-ramīrez AC, Gould FFJ, Ferré J, 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontr. Sci. Technol.*, 9: 239 –246.

Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA, 1990. Insect resistant cotton plants. *BioTechnology*, 8: 939 –943.

Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT, 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Ann. Rev. Entomol.*, 47: 845 –881.

Song YY, Zhou DR, He KL, 1999. Studies on mass rearing of Asian corn borer: Development of a satisfactory non-agar semi-artificial diet and its use. *Acta Phytophyl. Sin.*, 26(4): 324 –328. [宋彦英，周大荣，何康来，1999. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. 植物保护学报，26(4)：324 –328]

Wang DY, Wang ZY, He KL, Cong B, Bai SX, Wen LP, 2004. Temporal and spatial expression of Cry1Ab toxin in transgenic Bt corn and its effects on Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenee). *Sci. Agric. Sin.*, 37(8): 1 155 –1 159. [王冬妍，王振营，何康来，丛斌，白树雄，文丽萍，2004. Bt 玉米杀虫蛋白含量的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果. 中国农业科学，

37(8)：1 155－1 159］

Xiang XF, Wang CZ, Zhang SF, 1996. Pathological changes in midgut tissues of cotton bollworm larvae after infecting *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Entomol. Knowl.*, 33：266－268.［项秀芬，王琛柱，张书芳，1996. 棉铃虫幼虫感染苏云金杆菌戈尔斯德亚种(HD-1)后中肠细胞的病理变化. 昆虫知识，33(5)：266－268］

Yiallouros M, Storch V, Becker N, 1999. Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 74：39－47.

Zhang YJ, Zhao HY, Wu KM, Zhao KJ, Peng YF, Guo YY, 2007. Insecticidal activity of transgenic sck and cry1Ac/sck rice to *Chilo suppressalis* (Walker) and pathologic changes in their mid-gut tissues. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 13：220－223.［张永军，赵红盈，吴孔明，赵奎军，彭于发，郭予元，2007. 转 *sck* 单价基因和 *cry1Ac/sck* 双价基因水稻对二化螟的致死效应及中肠组织病理变化观察. 应用与环境生物学报，13(2)：220－223］

Zhou DR, He KL, 1995. Asian Corn Borer and Its Integrated Management. Golden Shield Press, Beijing. 102 pp.［周大荣，何康来，1995. 玉米螟综合防治. 北京：金盾出版社. 102 页］

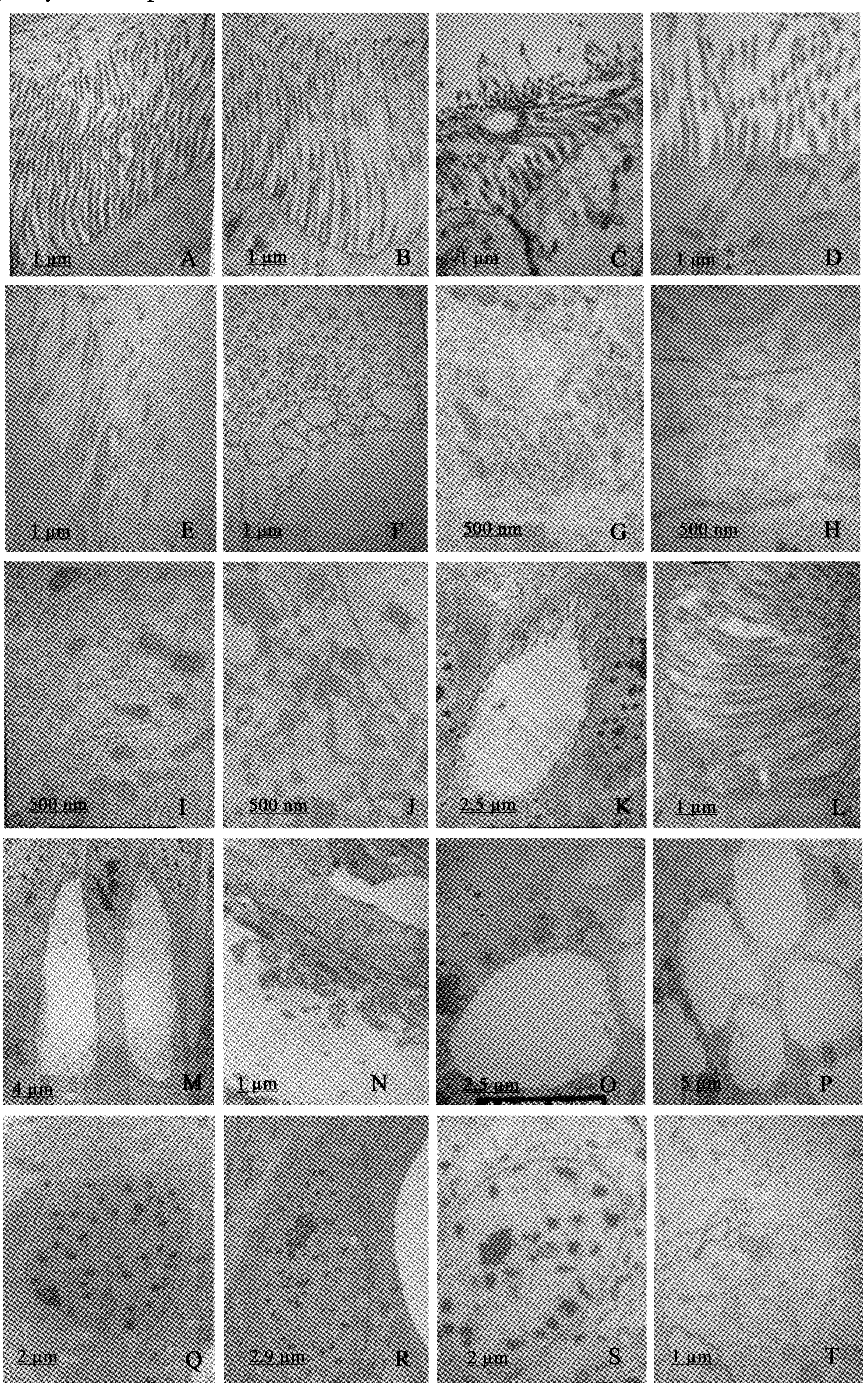
（责任编辑：赵利辉）

图版Ⅰ说明 Explanation of Plate Ⅰ

A：取食对照玉米后的玉米螟中肠细胞微绒毛 Midgut microvilli of *O. furnacalis* larvae feeding on control corn; B, C, D, E, F：取食 Bt 玉米 6, 12, 24, 48 和 72 h 后的玉米螟中肠细胞微绒毛 Midgut microvilli of *O. furnacalis* larvae at 6, 12, 24, 48 and 72 h after feeding on Bt corn, respectively; G：取食对照玉米后的玉米螟中肠细胞内质网 Endoplasmic reticulum of *O. furnacalis* larvae feeding on control corn; H, I, J：取食 Bt 玉米 12, 24 和 48 h 后的玉米螟中肠细胞内质网 Endoplasmic reticulum of *O. furnacalis* larvae at 12 , 24 and 48 h after feeding on Bt corn, respectively; K：取食对照玉米后的玉米螟中肠杯状细胞 Midgut goblet cell of *O. furnacalis* larvae feeding on control corn; L：取食对照玉米玉米螟中肠杯状细胞微绒毛 Midgut goblet cell microvilli of *O. furnacalis* larvae after feeding on control corn; M, O, P：取食 Bt 玉米 24, 48 和 72 h 后的玉米螟中肠杯状细胞 Midgut goblet cell of *O. furnacalis* at 24, 48 and 72 h after feeding on Bt corn, respectively; N：取食 Bt 玉米 24 h 后正在脱落的杯状细胞微绒毛 Midgut goblet cell microvilli of *O. furnacalis* larvae at 24 h after feeding on Bt corn; Q：取食对照玉米的玉米螟中肠细胞细胞核 Midgut cell mucleus of *O. furnacalis* larvae feeding on control corn; R, S：取食 Bt 玉米 24 和 72 h 中肠细胞细胞核 Midgut cell mucleus of *O. furnacalis* larvae at 24 and 72 h after feeding on Bt corn; T：取食 Bt 玉米 72 h 部分中肠细胞解体空泡化 Vacuolated midgut cells of *O. furnacalis* larvae at 72 h after feeding on Bt corn.

徐艳玲等：取食转 Bt 基因抗虫太米后亚洲玉米螟幼虫中肠的组织病理变化　　图版I

Xu Yan-Ling *et al.*: Histopathological changes in the midgut of larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), fed on Bt-transgenic corn expressing Cry 1 Ab protein　　Plate Ⅰ



图版说明见文后 Explanation at the end of the text